

TABLE 2. Treatments and additive combinations in the experiment

TABLE 3. The effect of different treatments on the fresh weight (g), dry weight (g) and fresh/dry weight ratio of *Tagetes patula* 'Csemő'

IRODALOMJEGYZÉK

- ADAMS, R., FONTENO, W. (2003): Media. In: HAMRICK, D. (ed.): Ball Redbook. 2. Crop Production. Ball Publishing, Batavia, Illinois, USA 19.
- BÍRÓ B. (2016): A talajok precíziós „baktériumtrágyázásának” lehetőségei és alapelvei. Agro Napló 9: 65-68.
- BÍRÓ B., ŠUMÁLAN, R., FARKAS E., SCHMIDT B. (2016): Az arbuskuláris mikorrhíza (AM) hatásának vizsgálata *Tagetes patula* L. foszforfelvételére és fejlődésére modellkísérletben. Kertgazdaság 48. (2): 45-52.
- BLINDA, A., ABOU-MANDOUR, A., AZARKOVICH, M., BRUNE, A., DIETZ, K.J. (1996): Heavy metal-induced changes in peroxidase activity in leaves, roots and all suspension cultures of *Hordeum vulgare* L. In: OBINGER, C., BURNER, U., EBERMANN, R., PENEL, C., GREPPIN, H. (ed.): Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. University Genova. 380-385.
- CHATURVEDI, N., AHMED, M.J., DHAL, N.K. (2014): Effects of iron ore tailings on growth and physiological activities of *Tagetes patula* L. J Soils Sediments 14: 721-730.
- FAIN, G.B., GILLIAM, C.H., SIBLEY, J.L., BOYER, C.R. (2008): Establishment of Greenhouse-Grown *Tagetes patula* and *Petunia x hybrida* in 'Whole-tree' Substrates. Acta Hort. (ISHS) 782. 387-393.
- GHOSH, P., PAL, P. (2010): Response of African marigold cv. Siracole to organic and inorganic nitrogen sources. Indian Journal of Horticulture Vol. 67. (3): 372-375.
- HORVÁTH G., ERDEI S. (2003): Növénybiokémiai és növényélettani gyakorlatok. Budapesti Közgazdaságtudományi és Államigazgatási Egyetem, Kertészettudományi Kar egyetemi jegyzet 26.
- HOU, J., YANG, G. (2011): Evaluation of Growing Medium Composition on Marigold (*Tagetes erecta* L.) Seedling Quality. Acta Hort. (ISHS) 891: 237-240.
- HOU, J., YANG, G., CHEN, L., ZHAO, CH. (2012): GGE Biplot as a novel tool for the investigation of marigold (*Tagetes erecta* L.) seedling growth on composted corn stalk as a substrate International Journal of Plant Biology 3: 8.
- KAPSIMALIS, M.T., OWEN, J.S., STOVEN, JR., STOVEN, H.M. (2011): Response of Containerized *Hydrangea macrophylla* 'Endless Summer' to a Mineral-polyacrylate Substrate Amendment and Reduced Overhead Water Application. Proceedings of SNA Research Conference 56. 2011.
- NAZARI, F., FARAHMAND, H., ESHGHI, S., NIKI, M., ESLAMZADE, M. (2008): The effect of different soil amendments on growth and flowering of African marigold (*Tagetes erecta* L.) 'Queen'. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 16: 403-415.
- NEGAHBAN, M., ABOUTALEBI, A., ZAKERIN, A. (2014): The Effect of Phosphorus on the Growth and Productivity of Mexican Marigold (*Tagetes minuta* L.). Russian Journal of Biological Research 2. (2): 93-99.
- NICHUALAIN, D., CARLILE, W., HYNES, C., PHELAN, G., O'HAIRE, R., DOYLE, O.P.E. (2011): Nutrient Status of Co-composted Indigenous Irish Wastes, and their Use in Growing Media. Acta Hort. (ISHS) 891: 85-92.
- POLARA, N. D.; GAJIPARA, N. N.; BARAD, A. V. (2015): Effect of nitrogen and phosphorus nutrition on growth, flowering, flower yield and chlorophyll content of different varieties of African marigold (*Tagetes erecta* L.). Journal of Applied Horticulture. 17. (1): 44-47.
- RAJADURAI, K. R., BEAULAH, A. (2000): The effect of inorganic fertilizers, Azospirillum and VAM on yield characters of African marigold (*Tagetes erecta*). J. of Ecotoxicology & Environmental Monitoring. 10. (2): 101-105.
- REMES, L. (2014): BRT EverGreen absorber grain effect on light peat and plantation growth (in Finnish: BRT EverGreen -imeytysrouheen vaikutus vaaleaan rahkatuopeeseen ja kasvien kasvuun) Master Thesis. University of Helsinki. Faculty of Agriculture and Forestry. Department of Agricultural Sciences.
- SARDOEI, A.S., ROIEI, A., SADEGHI, T., SHAHADADI, F., MOKHTARI, T.S. (2014): Effect of Vermicompost on the Growth and Flowering of African Marigold (*Tagetes erecta*). American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 14. (7): 631-635.
- SINGH, L. GURJAR, P. K. S., BARCHOLIA, A. K., HALDAR, A., SHRIVASTAVA, A. (2015): Effect of organic manures and inorganic fertilizers on growth and flower yield of marigold (*Tagetes erecta* L.) var. Pusa Narangi Gaiinda. Plant Archives 15. (2): 779-783.
- SRIDHAR, S., RENGASAMY, R. (2010a): Effect of Seaweed Liquid Fertilizer on the growth, biochemical constituents and yield of *Tagetes erecta*, under field trial. Journal of Phytology 2. (6): 61-68.
- SRIDHAR, S., RENGASAMY, R. (2010b): Studies on the Effect of Seaweed Liquid Fertilizer on the Flowering Plant *Tagetes erecta* in Field Trial. Advances in Bioresearch, 1. (2): 29-34.
- YAN, L., DONG Y., K., HYOUNG B., K., YOUNG. K. (2016): Effects of Geohumus Mixed with Artificial Soil on Soil Water Retention and Plant Stress Response. Journal of the Korea Society of Environmental Restoration Technology. 19. (1): 1-11.

A KERTI KAKUKKFŰ (*THYMUS VULGARIS* L.) ROZMARINGSAV-TARTALMA ÉS A ROZMARINGSAV-SZINTÁZ GÉN EXPRESSZIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA ELTÉRŐ VÍZELLÁTÁS HATÁSÁRATRÓCSÁNYI ESZTER¹, ZÁMBORINÉ NÉMETH ÉVA², GYÖRGY ZSUZSANNA¹¹Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénytermesztés Tanszék²Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyógy- és Aromanövények Tanszék

KULCSSZAVAK: RA, RAS enzim, vízellátás, stresszreakció, egyedfejlődés, környezeti tényezők

A kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) gyulladásgátló, antioxidáns, antibakteriális és antivirális hatása nagymértékben a benne található rozmaringsavnak köszönhető. Irodalmi adatok alapján növényi sejt- és kallusz-kultúrák rozmaringsav termelése *in vitro* körülmények között elicitorok alkalmazásával növelhető, de környezeti hatások is jelentősen befolyásolhatják a másodlagos anyagcseretermékek felhalmozódását. Vizsgálatunk célja a vízellátás hatásának tanulmányozása volt a rozmaringsav felhalmozódására és az ezzel fellelhetően összefüggő rozmaringsav-szintáz gén expressziójára. A kísérletet 2015-ben és 2016-ban klímakamrában, tenyészedényekben végeztük, melyeket a talaj vízkapacitásának 70%-os (kontroll) és 40%-os (kezelt) telítettségére töltöttünk fel. Megállapítottuk, hogy az alacsonyabb relatív vízkapacitású talajban nevelt kakukkfűben 1,5-4-szeres volt a rozmaringsav-felhalmozódás a kontrollgyedekhez képest, aminek gyakorlati jelentősége is lehet a termesztésben. A kísérleti időszak során a rozmaringsav-koncentráció ingadozott; s ez tendenciájában követi a rozmaringsav-szintáz enzim génjének relatív expresszióját. Ez utóbbi egyedenként eltérő szintű, de a változások azonos dinamikával jellemezhetőek.

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Napjainkban a klímaváltozás miatt kiemelkedő figyelem irányul a növényeket érő szélsőséges vízellátás hatása-ira (NELSON et al., 2013). A szemi-arid körülmények között élő gyógynövények a korlátozottan rendelkezésre álló víz és a nagyobb fényintenzitás miatt jobban ki vannak téve a szárazság-stressznek, mint a mérsékelt éghővön élő társaik. Ezekben a szemi-arid körülmények között élő gyógynövényekben szárazság-stressz hatására megváltozhat a másodlagos anyagcseretermékek felhalmozódása is. Egyes vélemények szerint a megfelelően alkalmazott szárazság-stressz a gyógynövények esetében a drog minőségi javulását eredményezheti (SELMAR és KLEINWACHTER, 2013).

A kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) a Földközi-tenger vidékén őshonos gyógynövény. Élvelő, fásodó szárú félcserje (Ch), mely a *Lamiaceae* családba tartozik (BERNÁTH és NÉMETH, 2007). Drogja a *Thymus vulgaris* és a *T. zygis* illóolaja (*Thymi aetheroleum*) és a virágos hajtása (*Thymi herba*), fő hatóanyaga az illóolaj (1,5-2,5%). Ezen kívül a virágos hajtás flavonoidokat (pl.: apigenin, luteolin, timonin, cirzilíneol, 8-metoxi-cirzilíneol, stb), kávé- és rozmaringsavat, valamint szaponinokat tartalmaz jelentős mennyiségben (ESCAP MONOGRAPHS, 2003).

A rozmaringsavat (RA) először két olasz kutató azonosította, és megállapították, hogy az a kávésav és a 3,4-dihidroxi-feniltejsav észtere. A rozmaringsav elnevezést is ők adták, miután elsőként a rozmaringból (*Rosmarinum officinalis* L.) izolálták (SCARPATI és ORIENTE, 1958). A rozmaringsav sokféle biológiai aktivitással rendelkezik, gyulladásgátló, antioxidáns, összehúzó, antitumagén, antibakteriális és antivirális hatása van. A RA bioszintézise L-fenilalaninból és L-tirozinból indul, melyekből számos enzimatis lépés során kialakul a RA két közvetlen prekursora, a 4-hidroxifeniltejsav és a 4-kumaroi-CoA, melyeket a bioszintézis utolsó lépéseként a rozmaringsav-szintáz enzim (RAS, E.C.2.3.1.140) észterkötéssel összekapcsol (PETERSEN és SIMMONDS, 2003).

Habár a másodlagos anyagcseretermékek akkumulációs potenciálja az adott faj genomja által szabályozott, a környezeti hatások nagymértékben befolyásolják a felhalmozódás szintjét (BADI et al., 2004; GOSZTOLA et al., 2010; KINDLOVICS et al., 2014). A rozmaringsav akkumulációját szintén befolyásolhatják környezeti hatások. Számos tanulmány beszámolt arról, hogy *in vitro* körülmények között a RA-felhalmozódás növelhető elicitorok

alkalmazásával. HIPPOLYTE és munkatársai (1992) aminosav prekursor adagolásával és alacsony ozmolaritású táptalaj alkalmazásával növelték *Salvia officinalis* kaluszkultúra RA-akkumulációját. XU és munkatársai (2008) 2,4D és BAP hormonokkal növelték *Coleus blumei* sejt kultúra RA-tartalmát, míg KIM és munkatársai (2013) metil-jazmonát elicitort alkalmaztak sikeresen *Agastache rugosa* sejt kultúra RA koncentrációjának növelésére. Egy másik esetben *Salvia miltiorrhiza* hajszálgöyökér-kultúrában élesztőkivonattal (biotikus) és ezüstionnal (abiotikus) történő elicitálással emelték meg a RA-akkumulációt (YAN et al., 2006).

Intakt növények esetében kevés kísérleti adat áll rendelkezésünkre a környezeti tényezők RA-felhalmozódásra gyakorolt hatásáról és nincs ismeret ennek genetikai hátteréről. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a vízellátás és a hőmérséklet a kerti kakukkfű növények RA-akkumulációját és ez visszavezethető-e a genetikai háttér indukciójára, azaz hogyan változik a RAS génexpressziója.

■ ANYAG ÉS MÓDSZER

■ A NÖVÉNYANYAG ELŐÁLLÍTÁSA

A kísérletekhez kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.) 'Varico 3' fajta (Mediseed, Switzerland) 10 hónapos palántáit használtuk. A növényeket Weiss-Gallenkamp SGC-120 típusú növénynevelő kamrában neveltük, FlorascaBio "B" közegbe ültetve (10% homok, 65% tőzeg, 25% marhatrágya). Minden tenyészedenyt 3,9 kg tömegre állítottunk be.

A növények egyik csoportját 70%-os relatív talajvízkapacitás (VK) mellett neveltük („kontroll”), a másik csoportban a relatív talajvízkapacitás 40% volt („kezelt”). A VK-t REYNOLDS (1970) ún. gravimetriás módszerével határoztuk meg és hetente 3 alkalommal, a vízutánpótláskor mindig a kísérletben előzetesen meghatározott tömegre töltöttük fel az egyes tenyészedenyeket.

A klímakamrában beállított körülményeket az 1. táblázat mutatja. 2015-ben a kísérlet 13 hétig futott egyféle környezeti feltételrendszerben, míg 2016-ban 12 hétig tartott, és ekkor két eltérő környezeti feltételrendszert is beállítottunk annak érdekében, hogy teszteljük a hőmérséklet hatását is a vizsgált paraméterekre (1. táblázat). A levegő relatív páratartalma minden esetben 50% volt.

A kísérlet időszakában négyhetente háromszor vettünk mintát, mindig 3 ismétlésben. A génexpressziós vizsgálatokhoz mindig ugyanazon 3-3 növényegységet vizsgáltuk. Mintavételek a növények 3-5 cm-es vegetatív hajtásvégeit gyűjtöttük, majd a minta felét szobahőmérsékleten megszáritottuk a RA-tartalom meghatározáshoz, a másik felét pedig folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk további felhasználásig.

A KLÍMAKAMRÁBAN BEÁLLÍTOTT KÖRNYEZETI PARAMÉTEREK 2015-BEN ÉS 2016-BAN			
A KEZELÉSEK IDŐTARTAMA 2015-BEN		HŐMÉRSÉKLET [°C] (NAPPALI/ÉJSZAKA)	FÉNY (LUX/NAPPALHOSSZ)
Kísérlet	5 hét (1-5)	16/10	20.000/12 óra
	4 hét (6-9)	20/14	20.000/14 óra
	4 hét (10-13)	22/16	20.000/14 óra
A KEZELÉSEK IDŐTARTAMA 2016-BAN		HŐMÉRSÉKLET [°C] (NAPPALI/ÉJSZAKA) 'MELEG' KAMRA	HŐMÉRSÉKLET [°C] (NAPPALI/ÉJSZAKA) 'HIDEG' KAMRA
Kísérlet	4 hét (1-4)	22/16	20/15
	4 hét (5-8)	24/17	20/15
	4 hét (9-12)	25/18	20/15

■ HPLC ANALÍZIS

3 g száraz, porított drogot 45 ml metanolban szuszpendáltunk, melyet vízfürdőben melegítettük 30 percig, majd hűtés és szűrés után 50 ml-re töltöttük fel az oldatot metanóllal. A kivonat RA tartalmát HPLC módszerrel határoztuk meg Waters HPLC készülékkel. Az analitikai körülmények megegyeznek a korábban publikáltakkal (RADACSI et al., 2016) a Ph.Eur. 8.6-ban leírt módszer alapján.

■ RNS-IZOLÁLÁS, CDNS-SZINTÉZIS, PCR

A fagyasztott kerti kakukkfű levelekből CTAB-alapú módszerrel izoláltuk az RNS-t (JAAKOLA et al., 2001). Az RNS-oldatok koncentrációjának meghatározását és a cDNS-oldatok koncentrációjának ellenőrzését NanoDrop ND-1000 (Bio-Science, Magyarország) spektrofotométerrel végeztük. Minőségüket 1%-os TBE agarózgélen ellenőriztük. Az RNS-oldatokat DNS-mentesítettük (DNase I, RNase-free, Thermo Scientific), majd a minták koncentrációjának kiegyenlítése után cDNS-t szintetizáltunk a SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline) segítségével. Az NCBI GenBank-ból letöltött *Melissa officinalis* RAS szekvencia alapján terveztük a vizsgálat során alkalmazott primerpárt: forward 5'-ATCACCCACAAATTAGGGCA-3' és reverz 5'-AAACAAGCTGCCGTCGTTAT-3'. A PCR-elegy összetétele az alábbi volt: 10× reakciópuffer (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,3 μM az adott primerekből és 0,5 U DreamTaq DNS-polimeráz (Fermentas). A PCR során alkalmazott hőmérsékleti profil a következő lépésekből állt: 95 °C 2 min, 35 ciklus során 95 °C 30 sec, 55 °C 30 sec és 72 °C 1 min, majd 72 °C 5 min. A PCR Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, USA) típusú készülékben történt. Az amplifikált terméket 1%-os TBE agarózgélen ellenőriztük, kivágtuk, majd EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction kittel (Bio Basic) tisztítottuk. A tisztított PCR-terméket pTZ57R/T vektorba klónoztuk (CloneJet PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) majd kompetens DH5α *Escherichia coli* sejtekbe transzformáltuk és felszaporítottuk. Az izolált plazmid DNS-t a Baygen Intézetben szekvenáltattuk meg.

■ KVANTITATÍV REAL TIME PCR

A PCR-rel 154 bp hosszúságú fragmentum amplifikálódott, mely 98%-os egyezést mutatott a *Melissa officinalis* RAS szekvenciával, így erre a szakaszra terveztük a kvantitatív real-time PCR során alkalmazott primereket. A real time PCR vizsgálatot 2015-ben Corbett Research gyártmányú Rotor Gene 6000 készülékben (QiAGEN) végeztük, 2016-ban pedig 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) készülék segítségével. A RT-qPCR relatív módon történő kiértékeléséhez előzetes vizsgálatok alapján az *EF1α* gént választottuk. A PCR-termékek olvadáspont vizsgálatával ellenőriztük az *EF1α* és a RAS génekre tervezett primerek specifikusságát. A PCR-elegy összetétele az alábbi volt: 2x SensiFast SYBR® No-ROX Mix, 400 nM forward és reverz primer 50x ROX, 5 ng cDNS (Bioline). A PCR során alkalmazott hőmérsékleti profil a következő lépésekből állt: 95 °C 2 min, 40 ciklus során 95 °C 5 sec, 60 °C 30 sec majd 72 °C 15 sec. Ezután az *EF1α* és RAS gén esetében is olvadáspont-analízissel ellenőriztük a PCR-termék specifikusságát.

■ EREDMÉNYEK

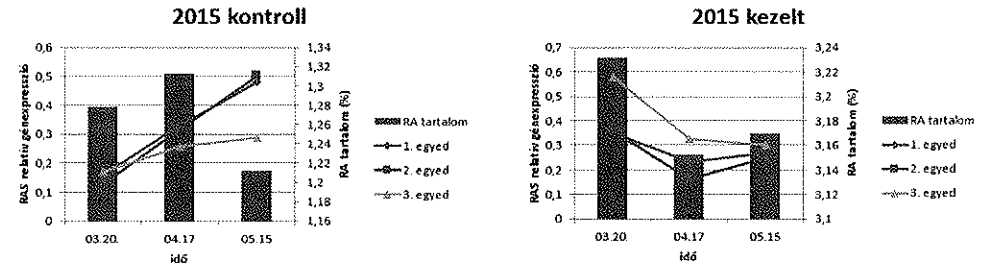
2015-ben a kontrollegységek kezdetben alacsony RAS génexpressziója folyamatosan növekedett. A RA-tartalom eleinte ezt a növekedést követte, majd az utolsó mintavételi időpontban enyhén csökkent. A vizsgált növényegységek relatív génexpressziós változása különböző mértékű volt, de a tendenciák megegyeznek, ez a kísérlet további részeiben is megfigyelhető volt. A kezelt egységek RAS génexpressziója eleinte igen magas volt, majd csökkenést figyeltünk meg. A RA-tartalom változása a RAS relatív génexpresszióhoz hasonlóan alakult, azaz az eleinte magasabb RA-tartalom csökkent (1. ábra).

2016-ban az alacsonyabb hőmérsékleten nevelt kontrollnövények RAS relatív génexpressziója az első mintavételi időpont után csökkent, majd növekedést figyeltünk meg. Ezzel párhuzamosan az eleinte magasabb RA-tartalom szintén lecsökkent, majd az utolsó időpontra ismét emelkedett.

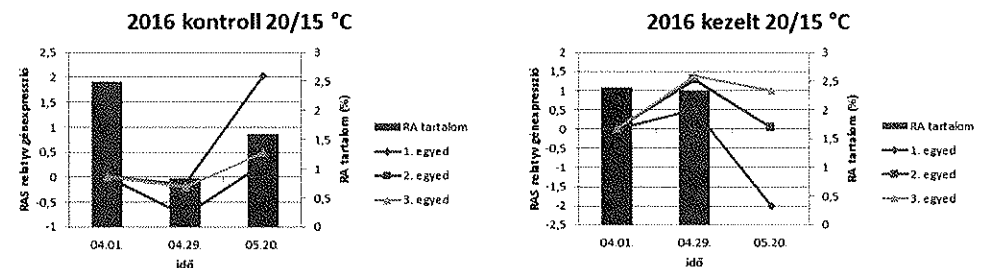
Ugyanezen a hőmérsékleten a 40%-os VK mellett nevelt növények („kezelt”) esetében nem volt megfigyelhető

a kontrollnál tapasztalt RA-tartalom csökkenés a második mintavételi időpontban. A harmadik mintavételi időpontból nincs adat. A RAS géneexpresszió ebben az esetben eleinte növekedett, majd visszaesést tapasztaltunk (2. ábra).

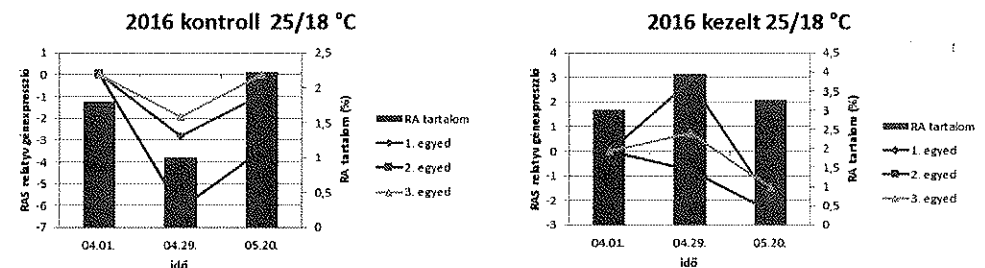
A magasabb hőmérsékleten a kontrollcsoport RAS relatív géneexpressziója a hidegebb kamrában nevelt kontrollcsoportéhoz hasonló tendenciákat mutatott: a kezdetihez képest először csökkent, majd növekedett. A RA-tartalom követte a RAS géneexpresszió változását. Ugyanakkor 25/18 °C hőmérsékleten 40%-os VK mellett nevelt növények („kezelt”) ellentétes dinamikát mutattak: a RAS géneexpresszió először emelkedett, majd a 3. mintavételi időpontra csökkent (3. ábra). A RA-tartalom ezzel párhuzamosan alakult, s megfigyelhető, hogy ebben a kamrában minden korábban említett növénycsoport adatait meghaladta a RA-tartalom szintje.



1. ÁBRA A rozmaringsav-szintáz (RAS) relatív géneexpresszió és a rozmaringsav (RA)-tartalom alakulása 2015-ben



2. ÁBRA A rozmaringsav-szintáz (RAS) relatív géneexpresszió és a rozmaringsav (RA)-tartalom alakulása 2016-ban, 20/15 °C (nappali/éjszakai) hőmérsékleten



3. ÁBRA A rozmaringsav-szintáz (RAS) relatív géneexpresszió és a rozmaringsav (RA)-tartalom alakulása 2016-ban, 25/18 °C (nappali/éjszakai) hőmérsékleten

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Számos *in vitro* kísérlettel bizonyították már, hogy elicitorok alkalmazása növeli a növények RA-tartalmát (HIPPOLYTE et al., 1992; XU et al., 2008; KIM et al., 2013; YAN et al., 2006). SZABÓ és munkatársai (1999) *Pythium aphanidermatum* gomba elicitorral és metil-jázmónáttal növelték *Coleus blumei* sejt kultúra RA-tartalmát. A gomba elicitor esetében a RA-tartalom növekedése mellett megnövekedett fenilalanin amónia-liáz és RAS géneexpressziót tapasztaltak. Később citromfű (*Melissa officinalis* L.) sejt kultúra RAS géneexpresszió vizsgálatakor is korrelációt figyeltek meg a RA-tartalom és a RAS géneexpresszió vizsgálatakor (WEITZEL és PETERSEN, 2011). Ez idáig a vízellátás RAS géneexpresszióra gyakorolt hatásáról még nem számolt be tanulmány.

Eredményeink alapján egyértelműnek látszik, hogy a 12-13 hetes kísérleti időszak során a RA-koncentráció minden esetben ingadozik, s ez tendenciájában követi a RAS gén relatív expresszióját. Ez utóbbi, adataink szerint növényegyedenként ugyan eltérő szintű, de a változások azonosnak tekinthető dinamikával jellemezhetők.

Megállapítottuk, hogy az alacsonyabb relatív vízkapacitású talajban nevelt kakukkfű esetében minden mérés során megnőtt a RA-felhalmozódás (1,5-4-szeresen) a 70% VK szintre feltöltött talajban nevelt kontroll egyedekhez képest. Ez alól kivételt jelentenek a 2016. évben a „hideg” kamra növényei, ahol ez a nagyságrendi eltérés nem tapasztalható. Ez várakozásunknak megfelelően arra enged következtetni, hogy a melegebb környezetben a talajnedvesség szintje fokozott jelentőségű a RA szintézisére. Megfigyelhető, hogy a legmagasabb RA-tartalom (3,2-4,0%) elérése után azonban minden esetben csökkenés tapasztalható (2015-ben már a második, 2016-ban a harmadik mintavétel alkalmával). E csökkenés oka lehet a felhalmozódási potenciál maximumának elérése vagy a növények adaptálódása a gyenge vízellátottsági viszonyokhoz, így a feltételezett stresszhatás mérséklődése.

A jobb vízellátottság mellett (70% relatív VK) nevelt növények RA-tartalma a 2%-ot ritkán haladta meg. A kezdeti értékek és a géneexpresszió csökkenése a kísérletek során arra utalhat, hogy e szint növelésének nincs az adott körülmények között életteni jelentősége a növény számára (2015-ben a tendencia ugyan kismértékű növekedés, de ez léptéktét tekintve csak 0,1% RA emelkedés, ami a fentiekhez képest nem számottevő). Kevésbé egyértelmű a kontrollcsoport növényeiben a harmadik mintavétel alkalmával tapasztalt emelkedés: ezt 2015-ben elsősorban a géneexpresszió, 2016-ban mind a mért RA-értékek, mind a géneexpressziós adatok mutatják. E változás oka lehet az, hogy bizonyos növény méret (lombfelület) elérése után már a 70% relatív talaj VK sem optimális a kakukkfűnek, de a növekedést indukálhatja esetleg más (pl. egyedfejlődési) háttértényező is.

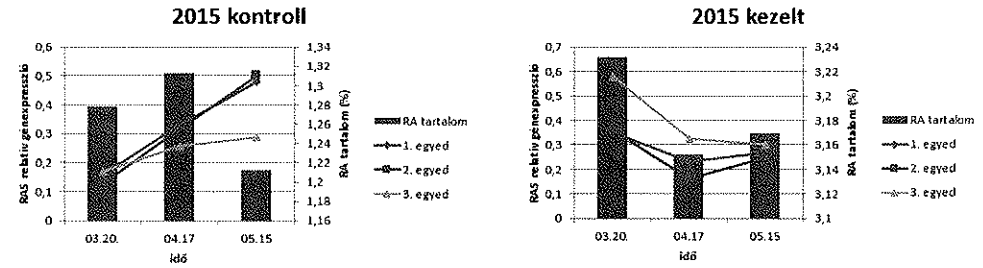
A kerti kakukkfű tipikusan xerofil növény, amely jól alkalmazkodik a szárazsághoz és egyéb kedvezőtlen körülményekhez (HORNOK, 1992). A fentiek értelmében tehát megállapíthatjuk, hogy a szárazabb talaj körülmények – különösen tartósan 20 °C feletti hőmérséklettel párosulva – a RA-tartalom emelkedését indukálják. Ez a gyakorlatban a drogminőség befolyásolásának egyik lehetőségét is jelentheti. A változások alapja eredményeink szerint valószínűleg a RAS gén megnövekedett expressziója, ami egyben megerősíti az enzim kulcsszerepét a RA bioszintézisében. Úgy tűnik azonban, hogy a leírt változásokban jelentős egyedi eltérések lehetnek, és feltehetően egyéb tényezők is szerepet játszanak. Így a RA védőfunkciója a kakukkfű szárazság stressz mérséklésében jelen adatok alapján nem egyértelmű, ennek bizonyításához további mérésekre van szükség.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

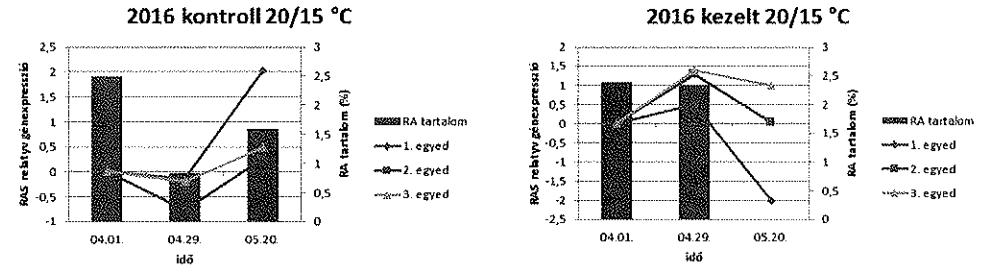
A szerzők köszönetüket fejezik ki a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutató Központ Mezőgazdasági Intézet Alkalmazott Genomika Osztályának, hogy rendelkezésünkre bocsátották a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) készüléket, ezzel lehetővé tették a 2016-os kvantitatív real time PCR-vizsgálatok elvégzését. Munkánkat az OTKA NN108633, és a BCE Kutatói Kiválósági Ösztöndíja támogatta. György Zs. köszönetét fejezi ki a Magyar Tudományos Akadémiának a Bolyai János Kutatási Ösztöndíjért.

a kontrollnál tapasztalt RA-tartalom csökkenés a második mintavételi időpontban. A harmadik mintavételi időpontból nincs adat. A RAS génexpresszió ebben az esetben eleinte növekedett, majd visszaesést tapasztaltunk (2. ábra).

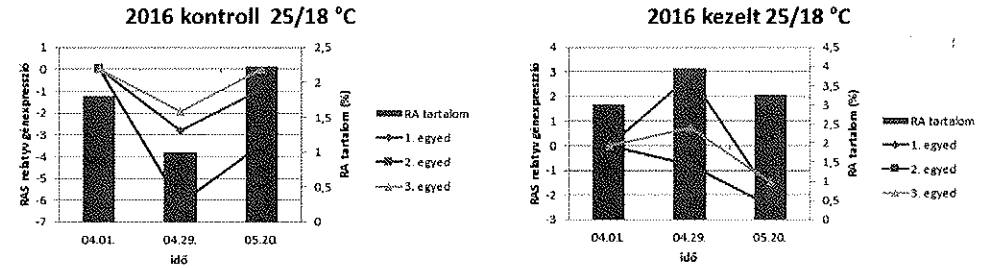
A magasabb hőmérsékleten a kontrollcsoport RAS relatív génexpressziója a hidegebb kamrában nevelt kontrollcsoportéhoz hasonló tendenciákat mutatott: a kezdetihez képest először csökkent, majd növekedett. A RA-tartalom követte a RAS génexpresszió változását. Ugyanekkor 25/18 °C hőmérsékleten 40%-os VK mellett nevelt növények („kezelt”) ellentétes dinamikát mutattak: a RAS génexpresszió először emelkedett, majd a 3. mintavételi időpontra csökkent (3. ábra). A RA-tartalom ezzel párhuzamosan alakult, s megfigyelhető, hogy ebben a kamrában minden korábban említett növénycsoport adatait meghaladta a RA-tartalom szintje.



1. ÁBRA A rozmaringsav-szintáz (RAS) relatív génexpresszió és a rozmaringsav (RA)-tartalom alakulása 2015-ben



2. ÁBRA A rozmaringsav-szintáz (RAS) relatív génexpresszió és a rozmaringsav (RA)-tartalom alakulása 2016-ban, 20/15 °C (nappali/éjszakai) hőmérsékleten



3. ÁBRA A rozmaringsav-szintáz (RAS) relatív génexpresszió és a rozmaringsav (RA)-tartalom alakulása 2016-ban, 25/18 °C (nappali/éjszakai) hőmérsékleten

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Számos *in vitro* kísérlettel bizonyították már, hogy elicitorok alkalmazása növeli a növények RA-tartalmát (HIPPOLYTE et al., 1992; XU et al., 2008; KIM et al., 2013; YAN et al., 2006). SZABÓ és munkatársai (1999) *Pythium aphanidermatum* gomba elicitorral és metil-jázmónáttal növelték *Coleus blumei* sejt kultúra RA-tartalmát. A gomba elicitor esetében a RA-tartalom növekedése mellett megnövekedett fenilalanin amónia-liáz és RAS génexpressziót tapasztaltak. Később citromfű (*Melissa officinalis* L.) sejt kultúra RAS génexpresszió vizsgálatakor is korrelációt figyeltek meg a RA-tartalom és a RAS génexpresszió vizsgálatakor (WEITZEL és PETERSEN, 2011). Ez idáig a vízellátás RAS génexpresszióra gyakorolt hatásáról még nem számolt be tanulmány.

Eredményeink alapján egyértelműnek látszik, hogy a 12-13 hetes kísérleti időszak során a RA-koncentráció minden esetben ingadozik, s ez tendenciájában követi a RAS gén relatív expresszióját. Ez utóbbi, adataink szerint növényegyedenként ugyan eltérő szintű, de a változások azonosnak tekinthető dinamikával jellemezhetők.

Megállapítottuk, hogy az alacsonyabb relatív vízkapacitású talajban nevelt kakukkfű esetében minden mérés során megnőtt a RA-felhalmozódás (1,5-4-szeresen) a 70% VK szintre feltöltött talajban nevelt kontrollgyedekhez képest. Ez alól kivételt jelentenek a 2016. évben a „hideg” kamra növényei, ahol ez a nagyságrendi eltérés nem tapasztalható. Ez várakozásunknak megfelelően arra enged következtetni, hogy a melegebb környezetben a talajnedvesség szintje fokozott jelentőségű a RA szintézisére. Megfigyelhető, hogy a legmagasabb RA-tartalom (3,2-4,0%) elérése után azonban minden esetben csökkenés tapasztalható (2015-ben már a második, 2016-ban a harmadik mintavétel alkalmával). E csökkenés oka lehet a felhalmozódási potenciál maximumának elérése vagy a növények adaptálódása a gyenge vízellátottsági viszonyokhoz, így a feltételezett stresszhatás mérséklődése.

A jobb vízellátottság mellett (70% relatív VK) nevelt növények RA-tartalma a 2%-ot ritkán haladta meg. A kezdeti értékek és a génexpresszió csökkenése a kísérletek során arra utalhat, hogy e szint növelésének nincs az adott körülmények között életteni jelentősége a növény számára (2015-ben a tendencia ugyan kismértékű növekedés, de ez léptékét tekintve csak 0,1% RA emelkedés, ami a fentiekhez képest nem számottevő). Kevésbé egyértelmű a kontrollcsoport növényeiben a harmadik mintavétel alkalmával tapasztalt emelkedés: ezt 2015-ben elsősorban a génexpresszió, 2016-ban mind a mért RA-értékek, mind a génexpressziós adatok mutatják. E változás oka lehet az, hogy bizonyos növény méret (lombfelület) elérése után már a 70% relatív talaj VK sem optimális a kakukkfűnek, de a növekedést indukálhatja esetleg más (pl. egyedfejlődési) háttértényező is.

A kerti kakukkfű tipikusan xerofil növény, amely jól alkalmazkodik a szárazsághoz és egyéb kedvezőtlen körülményekhez (HORNOK, 1992). A fentiek értelmében tehát megállapíthatjuk, hogy a szárazabb talaj körülmények – különösen tartósan 20 °C feletti hőmérséklettel párosulva – a RA-tartalom emelkedését indukálják. Ez a gyakorlatban a drogminőség befolyásolásának egyik lehetőségét is jelentheti. A változások alapja eredményeink szerint valószínűleg a RAS gén megnövekedett expressziója, ami egyben megerősíti az enzim kulcsszerepét a RA bioszintézisében. Úgy tűnik azonban, hogy a leírt változásokban jelentős egyedi eltérések lehetnek, és feltehetően egyéb tényezők is szerepet játszanak. Így a RA védőfunkciója a kakukkfű szárazság stressz mérséklésében jelen adatok alapján nem egyértelmű, ennek bizonyításához további mérésekre van szükség.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutató Központ Mezőgazdasági Intézet Alkalmazott Genomika Osztályának, hogy rendelkezésünkre bocsátották a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) készüléket, ezzel lehetővé tették a 2016-os kvantitatív real time PCR-vizsgálatok elvégzését. Munkánkat az OTKA NN108633, és a BCE Kutatói Kiválósági Ösztöndíja támogatta. György Zs. köszönetét fejezi ki a Magyar Tudományos Akadémiának a Bolyai János Kutatási Ösztöndíjért.

ROSMARINIC ACID ACCUMULATION AND ROSMARINIC ACID SYNTHASE GENE EXPRESSION IN THYME (*THYMUS VULGARIS* L.) DUE TO DIFFERENCES IN WATER SUPPLY

TRÓCSÁNYI, E.¹, NÉMETH-ZÁMBORI, É.², GYÖRGY, ZS.¹

¹Szent István University, Faculty of Horticultural Science, Department of Genetics and Plant Breeding

²Szent István University, Faculty of Horticultural Science, Department of Medicinal and Aromatic Plants

KEYWORDS: RA, RAS enzyme, water supply, stress reaction, ontogeny, environmental factors

SUMMARY

The antioxidant, antibacterial and antiviral effects of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.) may be traced back, to a large extent, to its rosmarinic acid (RA) content. In different cell- and callus cultures it was proven that elicitors may enhance the accumulation of RA *in vitro*. Besides, environmental circumstances might have a great effect on the synthesis of plant secondary compounds too. In the present experiment we investigated the effects of water supply on the accumulation of RA and the gene expression of the RAS gene. The pot experiments were conducted in 2015 and 2016 in climatic chambers, filling the pots to 70% (control) and 40% (treated) of the total water capacity (WC) of soil. It was established that the plants in the soil of lower relative WC accumulated 1.5-4.0 times more RA compared to the control individuals, which might have a practical significance in cultivation. The content of RA showed fluctuations during the examined period in parallel to the tendencies of the RAS gene relative expression. This gene expression shows individual differences, but changes are characterised by the same dynamics.

TABLE AND FIGURES

TABLE 1. The conditions of the climatic chambers in 2015 and 2016

FIGURE 1. RAS relative gene expression and RA content in 2015.

FIGURE 2. RAS relative gene expression and RA content in 2016 at 20/15 °C (day/night)

FIGURE 3. RAS relative gene expression and RA content in 2016 at 25/18 °C (day/night)

IRODALOMJEGYZÉK

1. BADI H.N., YAZDANI D., ALI S.M., NAZARI F. (2004): Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 19: 231–236.
2. BERNÁTH, J., NÉMETH, É. (2007): Gyógy- és fűszernövények gyűjtése, termesztése és felhasználása. Mezőgazda Kiadó 124-126.
3. ESCOP Monographs on the Uses of Plant Drugs (2003): *Thymi herba*. Thieme. Fascicule 1: 505-510.
4. GOSZOLA, B., SÁROSI, SZ., NÉMETH, É. (2010): Variability of the essential oil content and composition of chamomile (*Matricaria recutita* L.) affected by weather conditions. *Natural Product Communications* 5.(3): 465-470.
5. HIPPOLYTE I., MARIN B., BACCOU JC., JONARD R. (1992): Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Reports* 11(3): 109-12.
6. HORNOK, L. (1992): Cultivation and Processing of Medicinal Plants. John Wiley and Sons, Chichester, UK. 338
7. KIM YB., KIM JK., UDDIN MR., XU H., PARK WT., TUAN PA., LI X., CHUNG E., LEE JH., PARK SU. (2013): Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. *PLoS One* 8.(5): 64199.
8. KINDLOVITS, S., RADÁCSI, P., SÁROSI, SZ., INOTAI, K., NAGY, E., NÉMETH, É. (2014): Effect of weather conditions on the morphology, production and chemical composition of two cultivated medicinal and aromatic species. *European Journal of Horticultural Science* 79.(2): 76-83.
9. NELSON, G.C., VALIN, H., SANDS, R.D., HAVLÍK, P., AHAMMAD, H., DERYNG, D., ELLIOTT, J., FUJIMORI, S., HASEGAWA, T., HEYHOE, E., KYLE, P., VON LAMPE, M., LOTZE-CAMPEN, H., MASON D'CROZ, D., VAN MEIJL, H., VAN DER MENSBRUGGHE, D., MÜLLER, C., POPP, A., ROBERTSON, R., ROBINSON, S., SCHMID, E., SCHMITZ, C., TABEAU A., WILLENBOCKEL, D. (2013): Climate change effects on agriculture: Economic responses to biophysical shocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 3274–3279.
10. PETERSEN, M., SIMMONDS, M. (2003): Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62(2): 121-125.

12. RADÁCSI, P., SZABÓ, K., SZABÓ, D., TRÓCSÁNYI, E., NÉMETH-ZÁMBORI, É. (2016): Effect of water deficit on yield and quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Zemdirbyste-Agriculture* 103.(4): 385-390.
13. REYNOLDS, S. G. (1970): The gravimetric method of soil moisture determination. Part I. A study of equipment, and methodological problems. *Journal of Hydrology* 11: 258-273.
14. SELMAR D., KLEINWÄCHTER M. (2013): Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant Cell Physiology* 54.(6): 817-26.
15. SZABO, E., THELEN, A., PETERSEN, M. (1999): Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports* 18: 485–489.
16. WEITZEL, C., PETERSEN, M. (2011): Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry* 72.(7): 572-578.
17. XU H., KIM YK., JIN X., LEE SY., PARK SU. (2008): Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *Journal of Medicinal Plants Research* 2.(9): 237-241.
18. YAN, Q., SHI, M., NG, J., WU, JY. (2006): Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science* 70.(4): 853-858.